

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. November 2003 (27.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/098182 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**,
27/447

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/005091

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Mai 2003 (15.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 24 803.6 15. Mai 2002 (15.05.2002) DE
102 36 716.7 6. August 2002 (06.08.2002) DE
103 15 932.0 2. April 2003 (02.04.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **PROTEOSYS AG** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 51,
55129 Mainz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STEGMANN**, Werner
[DE/DE]; Flörheimer Strasse 38, 65439 Flörsheim (DE).
CAHILL, Michael [AU/DE]; Weinbergstrasse 34, 55296
Lörzweiler (DE). **SCHRATTENHOLZ**, André [DE/DE];
Hinter der Kirche 43, 55129 Mainz (DE).

(74) Anwalt: **PATENTANWÄLTE RUFF, WILHELM,
BEIER, DAUSTER & PARTNER**; Kronenstrasse 30,
70174 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— mit geänderten Ansprüchen

(88) Veröffentlichungsdatum des Internationalen
Recherchenberichts: 30. September 2004

Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche:
2. Dezember 2004

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

WO 2003/098182 A3

(54) Title: METHOD FOR QUANTIFYING MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MOLEKÜLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the ratio of the protein frequencies of proteins of the same type in a first and at least one second sample, to a method for determining the concentration of stable isotopes in molecules and to a method for determining the incorporation rate of labelled substances into proteins.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine in einer ersten und einer mindestens zweiten Probe ein Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Molekülen und ein Verfahren zur Bestimmung der Einbaurrate von markierten Substanzen in Proteine.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 23 Juli 2004 (23.07.2004) eingegangen;
ursprünglicher Anspruch 1 geändert; alle weiteren Ansprüche unverändert (2 Seiten)]

5

1. Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine und/oder Peptide, die an Ribosomen synthetisiert worden sind, in einer ersten (a) und einer mindestens zweiten (b) Probe, mit den Schritten:

- 10 - Markieren der Proteine der Probe (b) mit stabilen Isotopen, wobei die Proteine der Probe (b) mit stabilen Isotopen derart angereichert werden, dass der Markierungsgrad des zur Markierung verwendeten stabilen Isotops im markierten Protein kleiner als 90 %, insbesondere kleiner als 80 %, insbesondere
- 15 - Herstellung einer Proteinmischung (c) bekannter Proteinmengen aus der ersten (a) und der mindestens zweiten (b) Probe,
- 20 - getrennte Separation der Proteine der ersten Probe (a), der Proteinmischung (c) und der mindestens zweiten Probe (b) mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels und/oder eines chromatographischen Verfahrens,
- 25 - Gewinnung von Peptidfragmenten der separierten Proteine der jeweiligen Proben durch spezifische Spaltung oder enzymatischen Verdau, insbesondere tryptischen Verdau, der Proteine vor oder nach der Separation,
- 30 - Ermitteln der Isotopomerenverteilung der Proteine aus den Proben (a), (b) und (c) durch Massenspektrometrie mit MALDI-Ionenerzeugung, insbesondere durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie, und
- Berechnung der Verhältnisse der Proteinhäufigkeiten in der Proteinmischung (c) aus den ermittelten Isotopomerenvertei-

- lungen von entsprechenden Peptidfragmenten der Proben (a), (b) und (c), wobei die Isotopomerenverteilung eines Peptidfragments aus der Proteinmischung (c) als lineare Überlagerung der Isotopomerenverteilungen des entsprechenden Peptidfragments aus der unmarkierten Probe (a) und der markierten Probe (b) charakterisiert werden, so dass zu allen Einzelpeaks der Isotopomerenverteilungen aller massenspektrometrisch nachweisbarer Peptidfragmente eines Proteins auf diese Weise unabhängige Proteinhäufigkeitsverhältnisse bestimmbar sind, was durch die Vervielfachung der Messwertanzahl die Messgenauigkeit und Nachweisempfindlichkeit wesentlich verbessert, und vorzugsweise zur Bestimmung von Proteinhäufigkeitsverhältnissen überlappende Isotopomerenverteilungen, die durch geringe Markierungsgrade zustande kommen, heranziehbar sind und Proteinhäufigkeitsverhältnisse weitgehend unabhängig vom Markierungsgrad des Proteins bestimmbar sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine der Proben vor oder nach der Separation fragmentiert werden, insbesondere durch spezifische Spaltung oder Verdau der Proteine.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Proben aus einem in vivo-System stammen, insbesondere ein in vivo-System sind.